

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
25 de Agosto de 2005 (25.08.2005)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2005/077352 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷:
A61K 31/185, A61P 35/00, 17/06

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2005/070017

(22) Fecha de presentación internacional:
16 de Febrero de 2005 (16.02.2005)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200400371 17 de Febrero de 2004 (17.02.2004) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
INVESTREAD EUROPA, S.L. [ES/ES]; C/ Dr. Guiu, 36,
E-28035 Madrid (ES).

(72) Inventor; e

(75) Inventor/Solicitante (para US solamente): CUEVAS
SANCHEZ, Pedro [ES/ES]; Dr. Guiu, 36, E-28035
Madrid (ES).

(74) Mandatario: ELZABURU, Alberto de; C/ Miguel An-
gel, 21, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivin-
dicaciones y para ser republicada si se reciben modifica-
ciones

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: USE OF 2,5-DIHYDROXYBENZENESULPHONIC ACID IN THE PRODUCTION OF MEDICAMENTS FOR THE
TREATMENT OF ANGIODEPENDENT DISEASES SUCH AS CANCER AND PSORIASIS

(54) Título: USO DEL ÁCIDO 2,5-DIHIDROXIBENCENOSULFÓNICO, EN LA FABRICACIÓN DE MEDICAMENTOS DE
APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES ANGIOGÉNICAS COMO EL CÁNCER Y LA PSORIASIS

(57) Abstract: The invention relates to the use of 2,5-dihydroxybenzenesulphonic acid in the production of medicaments for the
treatment of angiodependent diseases. More specifically, the invention relates to the use of the aforementioned compound and, in
particular, the calcium and potassium salts thereof, for the treatment of two angiodependent diseases which present a reduction in
apoptosis, namely cancer and psoriasis. The invention also discloses the antiproliferative, antimigratory, antiangiogenic and proapop-
totic capacity of said family of compounds in non-quiescent cells. In addition, the invention details the potentiating effect of said
compounds on known cytostatic medicines in the treatment of tumours and, specifically, on gliomas. The invention further relates
to the therapeutic efficacy of said compounds, based on the combined antiproliferative, antiangiogenic and proapoptotic capacities
thereof, in the treatment of chronic psoriatic plaques.

(57) Resumen: Uso del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico, en la fabricación de medicamentos de aplicación en el tratamiento
de enfermedades angiodependientes. La invención cubre la aplicación de este compuesto y, particularmente de sus sales cálcica y
potásica, en el tratamiento de dos enfermedades angiodependientes y que presentan disminución de la apoptosis, como son el cáncer
y la psoriasis. La invención pone de manifiesto la capacidad antiproliferativa, antimigratoria, antiangiogénica y proapoptótica de
esta familia de compuestos en células no quiescentes. Asimismo refleja el efecto potenciador de estos compuestos sobre conocidos
fármacos citostáticos en el tratamiento de tumores, en concreto sobre gliomas. Por último se pone de manifiesto la eficacia terapéutica
de estos compuestos, basada en la combinación de sus capacidades antiproliferativa, antiangiogénica y proapoptótica, en el tratamiento
de placas psoriásicas crónicas.

WO 2005/077352 A1

Uso del ácido 2,5-Dihidroxibenzenosulfónico, en la fabricación de medicamentos de aplicación en el tratamiento de enfermedades angiogénicas como el cáncer y la psoriasis

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico, y su empleo en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por una intensa proliferación celular, gran vascularización (enfermedades
10 angiodependientes) y más particularmente enfermedades angiodependientes que presenten además disminución de la apoptosis, como ocurre por ejemplo en el cáncer o la psoriasis.

Antecedentes de la invención

15 Los tumores malignos se caracterizan, aparte de por su incontrolada proliferación celular, por su capacidad para invadir los tejidos peritumorales normales. La invasión tumoral es un proceso complejo que se desarrolla según las siguientes etapas consecutivas: a) adhesión de las células tumorales a proteínas de la matriz extracelular; b) degradación de las proteínas de la matriz
20 extracelular por proteasas que crean espacios extracelulares que las células tumorales utilizan para, c) migrar mediante un mecanismo dinámico y complejo que requiere la síntesis de nuevas porciones de la membrana citoplásmica y reorganización del citoesqueleto (Giese A, Westphal M. Neurosurgery 1996; 39: 235-252). Las células que desde la masa tumoral invaden el tejido peritumoral
25 normal tienen inactivado su programa genético de muerte celular programada y por ello, las células tumorales que migran para invadir los tejidos sanos peritumorales, eluden la apoptosis (Mariani I et al. Clin Cancer Res 7: 2480-2489,2001). Cuando las células tumorales agrupadas alcanzan una masa de 2 a 3 mm³, para contrarrestar la situación de hipoxia de este tumor primario, las
30 propias células tumorales sintetizan grandes cantidades de factores angiogénicos (Folkman J. N Engl J Med 285: 1182-1186, 1971; Carmeliet P, Jain RK. Nature 407: 249-257, 2000; Yancopoulos GD et al. Nature 407: 242-

248, 2000) que activan a los vasos sanguíneos peritumorales para que éstos formen nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) que invaden el tumor para aportar el oxígeno y los nutrientes y eliminar productos del catabolismo tumoral. Los mismos procesos celulares que acontecen durante la invasión tumoral
5 (motilidad y ausencia de apoptosis) suceden en sentido centrípeto durante la angiogénesis tumoral. Por lo tanto, la inhibición de la capacidad invasiva de las células tumorales y de las células endoteliales debería producir un retraso en el crecimiento tumoral al inhibir la expansión del tumor, disminuir la angiogénesis y promover la apoptosis. Por ello, un tratamiento eficaz contra el cáncer
10 debería inhibir la migración, la angiogénesis y aumentar la apoptosis sin producir estos efectos en células normales.

Existen numerosos agentes antitumorales y antiangiogénicos en diferentes estados de desarrollo clínico en oncología (Brem S. Cancer Control 6: 436-458, 1999), de los que un considerable número son polipéptidos que el organismo
15 utiliza para contrarrestar el efecto de los reguladores positivos de la angiogénesis (Hagedorn M, Bikfalvi A. Crit Rev Onc Hemat 34: 89-110, 2000). Sin embargo, cuando dichos polipéptidos se comparan con compuestos de peso molecular considerablemente inferior, se ponen de manifiesto sus inconvenientes farmacológicos. Por otra parte, se ha comprobado que
20 diferentes compuestos sintéticos que contienen anillos aromáticos en su molécula y actúan como inhibidores de la actividad mitogénica inducida por factores de crecimiento, son citotóxicos frente a células quiescentes o no tumorales (Lozano RM J Mol Biol 281: 899-9115, 1998). Sigue existiendo, por tanto, la necesidad de encontrar compuestos con actividad antitumoral,
25 antiangiogénica y proapoptótica de baja toxicidad para las células sanas, quiescentes, no tumorales. Actualmente existe un gran interés en la búsqueda de nuevas indicaciones terapéuticas para medicamentos antiguos. En este sentido se ha comprobado recientemente que diferentes antibióticos, aparte de su actividad antimicrobiana, poseen efectos antiproliferativos, como es el caso
30 de la rapamicina (Morice MC et al. N Engl J Med 346: 1773-1780, 2002), o de la neomicina (Cuevas P. et al. Neurol Res 224: 389-391, 2002); o son útiles

como ansiolíticos como la norfloxacin (fluroquinolona) (Johnstone TB et al. Nat Medicine 10; 31-32, 2004).

La psoriasis es una enfermedad crónica angiodependiente que afecta al 2-3% de la población mundial y se caracteriza por hiperplasia epidérmica, infiltración dermo-epidérmica de células inflamatorias y linfocitos T, y un desarrollo muy evidente de la vascularización (Robert C, Kupper TS. New Engl J Med 1999; 341: 1817-1828), junto con una disminución de muerte celular por apoptosis (Kocak M et al. Int J Dermatol 42: 789-793, 2003). Actualmente no existe ningún tratamiento curativo para la psoriasis. La terapia antipsoriásica puede ser tópica o sistémica, dependiendo de la extensión y de la gravedad de la enfermedad. La terapia tópica más utilizada consiste en diferentes tipos de corticoides, pero el uso prolongado de estos compuestos se asocia con atrofia cutánea, estrías y telangectasias (Baker BS, Fry L. Cutis 1999; 64: 315-318). La terapia sistémica con fármacos inmunosupresores se asocia a efectos secundarios muy importantes (Wolina V. et al. Clin Rheumatol 2001; 20: 406-410). Por ejemplo, el empleo de ciclosporina para el tratamiento de la psoriasis puede producir nefrotoxicidad (fibrosis intersticial y atrofia tubular), hipertensión, hipomagnesemia, hipercalcemia y disfunción hepática (Travis L, Weinberg JM. Drugs of Today 2002; 38: 847-865). También el uso prolongado de otro medicamento inmunosupresor para el tratamiento de la psoriasis, el tacrolimus, puede producir hipertensión, nefrotoxicidad e inmunosupresión (Jegasothy BV et al. Arch Dermatol 1992; 128: 781-785). Recientemente se ha descrito que la aplicación tópica del inmunosupresor tacrolimus acelera la carcinogenesis en la piel del ratón (Niwa Y, Terashima T, Sumi H. B J Dermatol 2003; 149: 960-967). Por ello, son necesarios nuevos compuestos antipsoriásicos que demuestren ser eficaces sin producir efectos secundarios evidentes como los que se asocian con los tratamientos antipsoriásicos más comunes.

El ácido 2,5 dihidroxibencenosulfónico es un derivado del ácido 2,5-dihidroxibenzoico que se formula farmacológicamente en forma de diferentes sales (fundamentalmente cálcica, potásica y magnésica) que le confieren estabilidad. El ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico se viene utilizando desde

los años 70 como medicamento vasculotrópico oral (Berthet P et al Int J Clin Pract 53: 631-636, 1999).

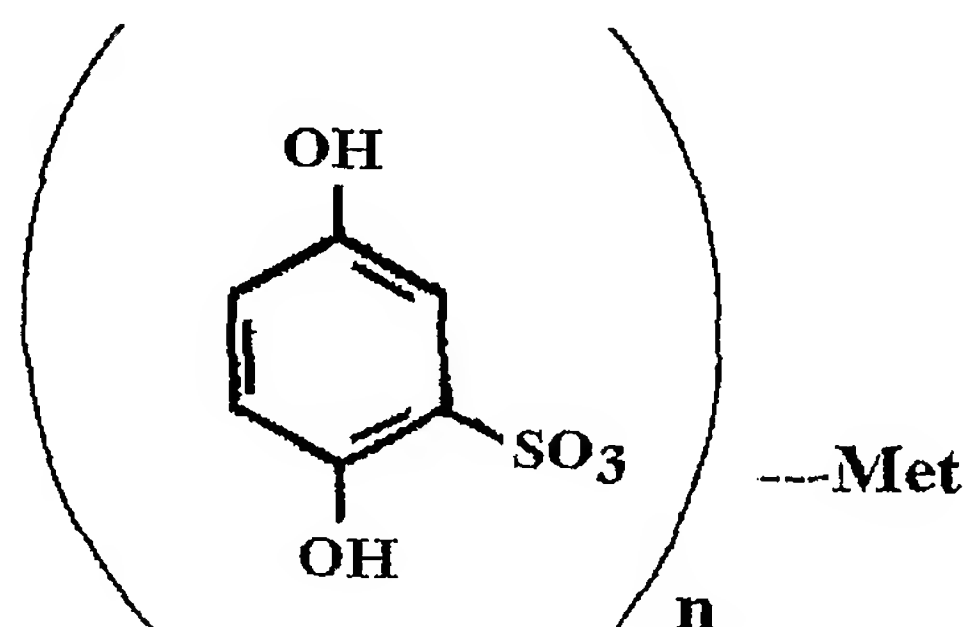
- El ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico inhibe la agregación plaquetaria, el aumento de la permeabilidad capilar y la viscosidad sanguínea en pacientes con retinopatía diabética (Bayer J. et al. Dtsch. Mod Wschr 1980; 46: 160-1608; Banarroch I.S. et al. Ophtalmic Res 1985; 17: 131-138; Michal M, Giessinger N. Thromb Res 1988; 51: 593-605). El metabolismo y la farmacocinética de este compuesto en el ser humano son conocidos desde el año 1974 (Benakis A. et al. Thérapie 1974; 29: 211-219). Recientemente se ha comprobado experimentalmente que el ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico aumenta la actividad de la isoforma endotelial de la enzima sintasa del óxido nítrico [endothelial nitric oxyde synthase (eNOS)] en células endoteliales de rata sin producir efectos citotóxicos (Suscheck C. et al. Bt J Pharmacol 1997; 122: 1502-1508). Además, el ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico es capaz de potenciar la relajación in vitro de arterias peneanas humanas (Angulo J et al. Br J Pharmacol 2003; 139: 854-862). Existe evidencia experimental de que el ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico (formulado como sal cálcica o magnésica) posee actividades antioxidantes in vitro (Brunet J et al. Fundam Clin Pharmacol 12: 205-212, 1998).
- La presente invención se basa en el descubrimiento de nuevas actividades del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico y/o sus sales, referidas a su capacidad antiproliferativa, antimigratoria, antiangiogénica y proapoptótica en células no quiescentes, actividades que, combinadas, justifican su empleo como compuesto útil para el tratamiento de enfermedades angiodependientes como es el caso del cáncer, caracterizado por una hiperproliferación, invasión celular y angiogénesis excesivas, junto con un déficit de muerte celular por apoptosis, sin presentar toxicidad para células sanas o quiescentes, no tumorales. En los experimentos se han utilizado células tumorales gliómicas, pues los gliomas son tumores muy invasivos con gran capacidad angiogénica y con un déficit apoptótico importante (Merzak A, Pilkington GJ. Cancer Metastasis Rev 16: 155-177, 1997).

La presente invención se basa también en el hecho comprobado de que el ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico y/o sus sales poseen, de forma combinada, efectos antiproliferativos, antiangiogénicos y proapoptóticos, por lo que se ha procedido a valorar la eficacia terapéutica del mismo en placas psoriásicas crónicas caracterizadas por una hiperproliferación epidérmica, una intensa angiogénesis dérmica y un déficit apoptótico (Karasek MA, Cutis 64: 319-322, 1999).

La presente invención está relacionada pues con la búsqueda de nuevos tratamientos contra el cáncer y otras enfermedades angiodependientes y se basa en que el hecho de que el ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico y/o sus sales, han mostrado la capacidad de inhibir el crecimiento, la migración e inducir la apoptosis en células tumorales in vitro así como capacidad para inhibir in vivo la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento para fibroblastos (FGF). Por tanto, debido a la combinación de dichas capacidades, dichos compuestos resultan útiles en el tratamiento de los tumores malignos y enfermedades neoplásicas hematológicas así como en el tratamiento de otras patologías asociadas a una gran vascularización (enfermedades angiodependientes).

Descripción de la invención

El ácido 2,5-dehidroxibencenosulfónico formulado en forma de sales es un producto comercial (por ejemplo, la sal potásica puede adquirirse en Merck Farma y Química SA, Mollet del Vallés, Barcelona) con la siguiente fórmula molecular:



en la que Met = Metal y n es función de la valencia del metal empleado en la sal. Generalmente n 0 1 ó 2 al ser el catión metálico formador de la sal, monovalente (K) o divalente (Ca ó Mg).

Las nuevas actividades biológicas del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico no dependen del catión unido al anillo bencénico pues el ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico formulado con cualquier sal tiene efectos similares en la inhibición de la proliferación celular, la migración y la angiogénesis. En la presente invención se describen únicamente las actividades del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico formulado como sal potásica y cálcica sin olvidar que dentro del alcance de esta invención se encuentra cualquier sal farmacéuticamente aceptable del compuesto. El término "sales farmacéuticamente aceptables" incluye las sales metálicas o las sales de adición susceptibles de ser utilizadas en formas farmacéuticas. Las sales farmacéuticamente aceptables del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico pueden obtenerse a partir de ácidos o bases, orgánicos o inorgánicos, por métodos convencionales haciendo reaccionar el ácido o la base apropiadas con el compuesto.

Las composiciones farmacéuticas que contengan el ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico pueden presentarse en cualquier forma de administración que se considere adecuada; por ejemplo, por vía sistémica, oral, parenteral, uretral, rectal o tópica, para lo cual incluirán los excipientes farmacéuticamente aceptables necesarios para la formulación de la forma de administración deseada.

Los siguientes ejemplos ilustran y apoyan la invención y no deben ser considerados limitativos del alcance de la misma.

25

Ejemplo 1: Ensayo ilustrativo de la capacidad antiproliferativa del ácido 2,5-dehidroxibencenosulfónico.

Para este estudio, realizado in vitro, en tres experimentos diferentes triplicados se han empleado células gliómicas de rata (línea C6). Las células se cultivaron en un medio compuesto por DMEM [Dulbecco's modified Eagle's Medium (Gibco. Paisley UK)], 7,5% de suero fetal (Gibco) , 10 unidades/ml de penicilina

30

(Gibco) y 10 μ g/ml de estreptomicina (Gibco). Los cultivos fueron mantenidos en una atmósfera humidificada a 37°C. Para valorar el efecto del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico sobre la proliferación celular se sembraron 2 x 10⁴ células C6 por pocillo (15mm de diámetro) en placas de 24 pocillos. Los

5 cultivos experimentales fueron tratados durante 48 horas con diferentes concentraciones micromolares (μ M) del compuesto (sal cálcica o potásica del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico). Los cultivos controles vivieron 48 horas sin añadirles el compuesto. Después de 48 horas los cultivos fueron

10 fotografiados utilizando un microscopio invertido y posteriormente los cultivos fueron coloreados con violeta cristal (Merck Farma y Química SA. Mollet del Vallés, Barcelona) y procesados para determinar el número de células por pocillo utilizando un método espectrofotométrico. Como muestra la Figura 1 el

15 tratamiento con diferentes concentraciones del compuesto produce una inhibición de la proliferación celular dosis dependiente, obteniéndose una inhibición del 88% con una concentración de 100 μ M de la sal cálcica del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico (A). Con la misma concentración de la sal

20 potásica del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico se obtuvo una inhibición del 74% (B). La IC₅₀ se encuentra en un rango próximo a 25 μ M para la sal cálcica y entre 40 y 50 μ M para la sal potásica. Comparando la Figura 1A con la Figura

25 1B se observa que para conseguir el mismo porcentaje de inhibición en la proliferación celular tras el tratamiento con la sal cálcica del compuesto se necesita una concentración doble de sal potásica para obtener el mismo efecto. Esto es debido a que la sal cálcica del compuesto contiene dos moles de

30 principio activo (ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico) que en solución acuosa se separan de la sal. La Figura 2 muestra una imagen de un cultivo de células C6 después de 48 horas sin tratamiento (A), otra correspondiente a un cultivo de células C6 tratadas durante 48 horas con una concentración de 50 μ M de la sal cálcica del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico (B) y una tercera perteneciente a un cultivo de células C6 tratadas con 100 μ M de la sal potásica del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico durante 48 horas (C). Este estudio demuestra que el tratamiento con el compuesto inhibe la proliferación en células neoplásicas y corrobora el efecto antiproliferativo del compuesto

observado en células musculares lisas vasculares normales estimuladas in vitro con factores mitogénicos (Parés-Herbute N et al. Int J Angiol 8: S5-S10, 1999). Para discernir si la actividad antiproliferativa del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico está mediada por un efecto citotóxico o
5 proapoptótico realizamos diferentes experimentos que se detallan en el ejemplo siguiente.

Ejemplo 2: Ensayo ilustrativo de la capacidad proapoptótica del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico.

10 Este ensayo se realizó en células C6 cultivadas in vitro según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Para la demostración del efecto proapoptótico de los compuestos analizados, hemos empleado dos métodos diferentes que detectan la fragmentación intracelular del ADN y los núcleos apoptóticos in situ.

15 **Detección de la fragmentación intracelular del ADN.**

Los métodos de inmunoensayo enzimático que cuantifican los fragmentos del ADN asociado a histonas pueden considerarse idóneos para determinar el inicio de la apoptosis (Aragane Y et al. J Cell Biol 1998; 140: 171-182). Este método permite diferenciar la muerte por necrosis de la muerte por apoptosis
20 ya que en la necrosis se rompe la membrana citoplásmica y el ADN aparece en el medio de cultivo, mientras que en la apoptosis el ADN fragmentado permanece en el interior de la célula pues la membrana plásmica se conserva intacta (Aragane Y et al. J Cell Biol 140: 171-182, 1998).

Utilizando el kit Cell Death Detection ELISA^{plus} (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, hemos
25 determinado la fragmentación del ADN en cultivos de células C16 (2×10^3) a las 4, 16, 24 y 48 horas. Los cultivos controles no recibieron tratamiento mientras que a los cultivos experimentales se les añadió de 50 a 200 μ M (Fig. 3A) de la sal potásica del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico. También se
30 realizaron experimentos añadiendo 25 a 100 μ M de la sal cálcica del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico (Fig. 3B). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado en tres experimentos diferentes.

Las Figuras 3A y 3B demuestran lo siguiente: a) el efecto antiproliferativo del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico está mediado fundamentalmente por una actividad propapotótica; b) el catión unido a la molécula no condiciona la actividad del compuesto pues el efecto proapoptótico es similar utilizando la sal
5 cálcica o potásica del mismo; c) el mayor efecto proapoptótico se consigue en células tratadas durante 48 horas con el compuesto; d) el máximo efecto se consigue con una concentración de 25 μ M para la sal cálcica y 50 μ M para la sal potásica, idénticas a la IC₅₀ en estudios de proliferación celular.

Una vez comprobado que en el mecanismo antiproliferativo del ácido 2,5-
10 dihidroxibencenosulfónico participa en la muerte celular por apoptosis, valoramos cuantitativamente dicho efecto estudiando microscópicamente las células gliómicas utilizando la siguiente técnica.

Detección in situ de núcleos apoptóticos (Técnica TUNEL).

15 Se realizaron tres experimentos independientes repetidos tres veces. Las células C6 procedentes de los cultivos controles y los procedentes de los cultivos tratados durante 24 horas con el compuesto (50 μ M y 100 μ M de la sal cálcica y potásica respectivamente) fueron adheridas a portaobjetos de vidrio donde se fijaron con una solución tamponada (pH 7,4) de paraformaldehído al
20 4% durante una hora a la temperatura del laboratorio. Posteriormente las células fueron lavadas y permeabilizadas con una solución al 0.1% de Triton X-100. Seguidamente las células fueron lavadas antes de aplicar la técnica TUNEL [(terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick and labelling (Gavrieli Y, Sherman Y, Bensasson SA. J Cell Biol 119: 493-501,
25 1992)]. Utilizando un kit para detectar in situ núcleos apoptóticos (In situ Cell Death Detection Kit Boehringer Mannheim, Mannheim. Alemania). Las diferentes etapas de la técnica se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante del kit. Finalmente las células fueron coloreadas con verde luz (Fluka, AG, Suiza). La reacción TUNEL sólo aparece en los núcleos
30 apoptóticos.

Aunque se obtuvieron resultados muy similares con la sal cálcica y potásica del compuesto objeto de la invención, en la memoria se presentan únicamente los

resultados obtenidos con la sal potásica del compuesto. Se contaron las células en 6 campos diferentes en 12 portaobjetos donde se habían adherido las células de 6 cultivos controles y de 6 cultivos tratados con el ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico (100 μ M). El número total de células no apoptóticas y apoptóticas fue el siguiente:

Células C6	Núcleos apoptóticos	Núcleos normales
Controles	138	5954
Tratadas	3846	354

El número total de células tratadas es menor que el número total de células controles debido al efecto antiproliferativo del compuesto.

En las imágenes de la Figura 4 se representa un área de un experimento de un cultivo control (A y B) y de otro cultivo tratado con el compuesto (C y D) en los que se empleó la técnica TUNEL. Como se muestra en las imágenes sólo se observan 2 núcleos apoptóticos en las células controles, mientras que en las células tratadas con el compuesto objeto de la invención aparecen 107 núcleos apoptóticos y sólo 8 núcleos normales (no apoptóticos).

Estos datos demuestran que el ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico es un compuesto con gran actividad proapoptótica útil para inducir la apoptosis tumoral. Como se ha demostrado que el ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico inhibe la apoptosis en células humanas normales (Braber R, Farine JC, Lora GA. Apoptosis 4: 4111-49, 1998) este compuesto es una molécula firme candidata para el tratamiento del cáncer.

Uno de los mecanismos implicados en el fracaso terapéutico de la quimio y la radioterapia es la ineficacia de estos tratamientos en inducir la muerte celular por apoptosis, debido fundamentalmente a la hiperexpresión de proteínas antiapoptóticas en las células tumorales (Sellers WR, Fisher DE. J Clin Invest 104: 1655-1661, 1999; Branch P. et al. Oncogene 19: 3138-3145, 2000). Por ello, los compuestos proapoptóticos pueden ser de gran utilidad clínica como coadyuvantes en el tratamiento quimio y radioterapéutico.

Una vez comprobado el efecto proapoptótico del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico hemos valorado la capacidad de este compuesto en aumentar el efecto antiproliferativo de diferentes medicamentos citostáticos. En el siguiente ejemplo se demuestra como el ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico es capaz de aumentar la eficacia terapéutica de diferentes compuestos citostáticos empleados en oncología, como el cis-platino, la vincristina, el paclitaxel y el 5-fluorouracilo.

Ejemplo 3: Ensayo ilustrativo de la capacidad del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico en la quimiopotenciación.

Para este estudio, hemos empleado células C6 cultivadas in vitro en las mismas condiciones que las descritas en el ejemplo 1. Se sembraron 1×10^3 células por pocillo en placas de 24 pocillos. Se realizaron tres tipos de tratamiento: a) a las 24 horas después de la siembra, las células fueron tratadas independientemente con cada uno de los siguientes fármacos; cis-platino (5 $\mu\text{g/ml}$), vincristina (0,1 $\mu\text{g/ml}$), paclitaxel (5 $\mu\text{g/ml}$) y 5-fluorouracilo (100 $\mu\text{g/ml}$); b) a las 24 horas después de la siembra, las células fueron tratadas conjuntamente con el ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico (sal potásica, 100 μM) y con cada uno de los siguientes fármacos; cis-platino (5 $\mu\text{g/ml}$) vincristina (0,1 $\mu\text{g/ml}$), paclitaxel (5 $\mu\text{g/ml}$) y 5-fluorouracilo (100 $\mu\text{g/ml}$); c) en el momento de realizarse la siembra (Día 0), las células fueron pretratadas con el ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico (sal potásica, 100 μM). Al día siguiente, los cultivos fueron tratados además con cada uno de los siguientes fármacos: cis-platino (5 $\mu\text{g/ml}$) vincristina (0,1 $\mu\text{g/ml}$), paclitaxel (5 $\mu\text{g/ml}$) y 5-fluorouracilo (100 $\mu\text{g/ml}$). Los cultivos controles no recibieron tratamiento durante 2 días. A las 48 horas (día 2) se valoró en todos los cultivos el número de células de idéntica forma a la usada en el ejemplo 1. Este estudio se efectuó en experimentos independientes triplicados repetidos tres veces.

En la figura 5 (A, B, C y D) se representan los histogramas de los experimentos realizados para valorar el efecto del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico en la potenciación de diferentes fármacos citostáticos. El tratamiento con cis-platino, vincristina y 5-fluorouracilo produce una inhibición del 50% en la proliferación

de células C6, mientras que el tratamiento con paclitaxel consigue un 67% de inhibición de la proliferación celular. El tratamiento conjunto del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico + los fármacos citostáticos (cis-platino, vincristina y 5-fluorouracilo) produce una inhibición del 84% en la proliferación celular. El

5 tratamiento conjunto con 2,5-dihidroxibencenosulfónico + paclitaxel produce un 86% en la inhibición de la proliferación celular. Cuando los cultivos celulares son pretratados con el ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico y posteriormente con los siguientes citostáticos: cis-platino, vincristina y 5-fluorouracilo se consigue una inhibición del 90% en la proliferación celular. Cuando se emplea

10 el paclitaxel, la inhibición en la proliferación celular alcanza hasta el 92%.

Los resultados anteriormente expuestos demuestran que el tratamiento simultáneo del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico y de agentes quimioterapéuticos aumenta la eficacia terapéutica de los mismos y además, este efecto quimiopotenciador es mayor cuando las células han sido pretratadas con el

15 ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico. Estos datos apoyan el empleo del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico como tratamiento coadyuvante asociado a la quimio y radioterapia.

Ejemplo 4: Ensayo ilustrativo de la capacidad antimigratoria del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico.

Este ensayo se efectuó en tres experimentos diferentes triplicados. Para valorar la capacidad del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico en la inhibición de la migración celular se utilizaron 2×10^5 células C6 cultivadas in vitro en placas de 20mm. Con ayuda de una micropipeta estéril se practicó una lesión

25 longitudinal (día 0) en cultivos controles y en cultivos tratados con 100 μ M de la sal potásica del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico. Se realizaron fotos digitalizadas utilizando un sistema fotográfico conectado a un microscopio luminoso y con un programa de morfometría computarizada (Moticam. Motic. Barcelona) se delimitó el área de lesión. A las 24 horas se volvieron a obtener

30 fotografías y se marcaron los bordes de la lesión superponiendo las primeras fotos (día 0) con las obtenidas a las 24 horas para calcular el porcentaje del área lesionada cubierta por las células migratorias. Estos valores se

representaron como porcentaje de regeneración obtenida con el tratamiento. En la Figura 6 se representa un ejemplo típico de un experimento control (A) y de otro experimento en el que las células fueron tratadas durante 24 horas con el compuesto objeto de la invención (B). Como se observa en esta Figura 5 las células no tratadas regeneran completamente la lesión (Fig. 6A), mientras que las células tratadas con el compuesto no son capaces de migrar y recubrir toda el área de la lesión (Fig. 6B). En la Figura 7 que representa los datos porcentuales de todos los experimentos se observa que el ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico inhibe hasta un 64% la migración de células 10 tumorales.

Ejemplo 5: Ensayo ilustrativo de la capacidad antiangiogénica del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico.

Para este ensayo hemos utilizado la membrana corioalantoidea del embrión de 15 pollo que permite testar in vivo la actividad de sustancias antiangiogénicas (Zilberberg L. et al. J Biol Chem 2003; 278: 35564-35573). Como compuesto proangiogénico, hemos utilizado la forma básica del factor de crecimiento para fibroblastos (bFGF) (Meghna U et al. Blood 2003; 102: 2108-2114).

Huevos fecundados se incuban en una estufa a 37°C y una humedad del 80%. 20 Después de 4 días se practica una apertura de la cáscara del huevo en el polo más agudo del mismo para aspirar 1ml de albúmina. Posteriormente se cierra la apertura con una lámina de parafina (Parafilm M Laboratory Film Chicago IL. USA). Este procedimiento permite crear una cámara de aire que impide que el embrión se adhiera a la parte superior de la cáscara. El día 13 de incubación se 25 rompe la cáscara a nivel de la cámara de aire para poder efectuar el tratamiento. Veinte embriones son tratados con 5µl de una solución de 3µg de bFGF + 0.1% de heparina, embebida en un disco de papel de nitrocelulosa. Seguidamente se sella la cáscara con lámina de parafina. Al día siguiente, en la mitad de los embriones (n=10) se produce la apertura de la cáscara para 30 empapar de nuevo del disco de papel de nitrocelulosa con 100 µM de sal potásica del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico disuelta en suero fisiológico (5µl). De nuevo se vuelve a cerrar la apertura de la cáscara con lámina de

parafina. El día 17 termina el experimento fotografiándose los discos de nitrocelulosa para su estudio comparativo.

En la Figura 8 se presentan dos imágenes correspondientes a un embrión tratado con 3 μ g de bFGF + 0,1% de heparina (A) y a otro al que se añadió al siguiente día además 100 μ M de una solución de sal potásica del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico (B). En la imagen A se observa como el disco de nitrocelulosa aparece invadido por vasos sanguíneos, mientras que en la imagen B se aprecia una escasísima invasión vascular en el disco. La cuantificación morfométrica de las imágenes de los discos de nitrocelulosa utilizando un sistema computarizado (Moticam Motic. Barcelona) muestra el efecto antiangiogénico del compuesto (área del disco cubierta por vasos sanguíneos en embriones tratados con bFGF + heparina = $35 \pm 8.6\%$ vs área del disco cubierta por vasos sanguíneos en embriones tratados con bFGF + heparina + sal potásica del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico = $2 \pm 1,5\%$; $p < 0,0001$; test de student no pareado). Efectos similares se obtuvieron utilizando 50 μ M de la sal cálcica del compuesto. Este experimento demuestra que el compuesto, objeto de la presente invención, posee actividad antiangiogénica al ser capaz de neutralizar el efecto angiogénico inducido por el bFGF.

20

Ejemplo 6: Ensayo sobre lesiones psoriásicas

Para este estudio hemos empleado la sal potásica del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico formulada al 2,5 y 5% en forma de crema, por ser este tipo de formulación un procedimiento habitual para el tratamiento tópico de enfermedades cutáneas. Las concentraciones elegidas de las sales del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico se encuentran dentro del rango de las concentraciones utilizadas para el tratamiento de la retinopatía diabética: 6 comprimidos diarios de 500mg de la sal cálcica del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico (Benakis A et al Therapie 1974; 29: 211-219). Como fase acuosa de la crema hemos utilizado agua destilada. La fase grasa de la misma puede estar constituida por alcohol cetílico, alcohol esteárico o vaselina. El span es un emulgente eficaz en la elaboración de la crema. Aunque ambas

formulaciones (2,5 y 5%) del producto muestran ser eficaces clínicamente, el mayor beneficio terapéutico se obtiene con la concentración al 5%. Por ello, presentamos los resultados obtenidos con el ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico formulado en forma de crema al 5%. El siguiente ejemplo
5 ilustra la formulación de una crema eficaz en el tratamiento tópico de la psoriasis y no debe ser considerado limitativo del alcance de la invención:

I.- Parte activa (sal potásica del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico al 5,6%)

II.- Parte inactiva. Como excipientes se pueden utilizar alcohol cetílico (2,5%), alcohol estearílico (2,5%), vaselina líquida (30%), vaselina filante (20%),
10 sorbinato deato (5%) y agua destilada (c.s.p. 100g).

La eficacia clínica del tratamiento fue evaluada de acuerdo con el índice DEI que cuantifica los signos de descamación (D), eritema (E) e infiltración (I) a los que se asignó la siguiente valoración: (0) ausente; (1) leve; (2) moderada y (3) severa (Freeman AK et al. J Am. Acad Dermat 2003; 48: 564-568). En la Figura
15 9 aparecen tres imágenes: antes del tratamiento, a los seis y a los trece días de tratamiento de una misma placa psoriásica crónica localizada en la zona de extensión del codo izquierdo tratada con la sal potásica del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico al 5%,. Como puede observarse, el tratamiento tópico dos veces al día con una crema conteniendo la sal potásica del ácido
20 2,5-dihidroxibencenosulfónico produce precozmente (6 días) un "aclaramiento" muy notable de la placa con desaparición casi total de la hiperqueratosis. La eficacia terapéutica de la crema es más evidente al final de la segunda semana de tratamiento. El tratamiento produce una reducción importante de los valores globales del índice DEI (DEI global pretratamiento = $6 \pm 1,57$ vs DEI global
25 postratamiento = $1 \pm 0,58$; $p < 0,0001$; test de student no pareado).

Leyenda de figuras

1. Histograma que representa el efecto antiproliferativo del tratamiento con diferentes concentraciones de las sales (A) cálcica y (B) potásica del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico en cultivos de células C6 después de 48 horas de tratamiento. Ordenadas: Absorbancia a 595 nm; Abcisas: concentración μM .
5
2. El panel A representa el aspecto a las 48 horas de un cultivo control de células C6. El panel B muestra una imagen de un cultivo de células C6 tratadas durante 48 horas con $50\mu\text{M}$ del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico (sal cálcica). El panel C es un aspecto de un cultivo de células C6 tratadas durante 48 horas con $100\mu\text{M}$ de la sal potásica del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico.
10
3. Histogramas representativos en donde se observa que el efecto antiproliferativo del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico no es debido a necrosis (histograma blanco) sino a apoptosis (histograma rayado). A: Tratamiento con la sal cálcica del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico. B: Tratamiento con la sal potásica del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico. Ordenadas: Absorbancia a 405 nm; Abcisas: tiempo en horas.
15
4. Imágenes de células C6 gliómicas procesadas con la técnica TUNEL para detectar in situ células apoptóticas. Los núcleos apoptóticos aparecen oscuros y los núcleos y citoplasma de las células no apoptóticas aparecen de color claro. Las flechas indican núcleos apoptóticos. A y B: células controles. C y D: células tratadas con el ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico. Las fotografías B y D corresponden a una amplificación de los recuadros de las fotografías A y C, respectivamente.
20
25
5. Histogramas demostrando el efecto quimiopotenciador (valorado como efecto antiproliferativo) del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico, con diferentes compuestos citostáticos. A) Cis-platino ($5\mu\text{g/ml}$); B) Vincristina ($0.1\mu\text{l/ml}$); C) Paclitaxel ($5\mu\text{g/ml}$) y D) 5-fluorouracilo ($100\mu\text{g/ml}$). Ordenadas: Absorbancia a 595 nm; Abcisas: histograma blanco (control); punteado (citostático; día 1); histograma rayado (ácido 2,5-
30

- dihidroxibencenosulfónico + citostático; día 1); histograma a cuadros (ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico (día 0) + citostático; día 1).
- 5 6. Imágenes fotográficas de la migración celular en un experimento control (A) y en otro experimento en donde las células fueron tratadas con el ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico (B). Las células controles regeneran totalmente una lesión practicada en el cultivo, mientras que la migración celular de las células tratadas con el ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico es incapaz de cubrir totalmente el área lesionada del cultivo. Las líneas horizontales delimitan la lesión longitudinal inicial practicada en los cultivos.
- 10 7. Histograma representando la capacidad migratoria de las células C6 en cultivos controles (histograma blanco) y en cultivos tratados con el ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico (histograma negro). La capacidad migratoria se expresa (ordenadas) como el porcentaje de regeneración (porcentaje de área cubierta de una lesión longitudinal practicada en los cultivos).
- 15 8. Muestra imágenes de dos embriones de pollo de 17 días de incubación. El panel A corresponde a un embrión tratado con 3 μ g de bFGF + 0,1% de heparina. El panel B muestra el aspecto de un embrión tratado con 3 μ g de bFGF + 0.1% de heparina + 100 μ M de la sal potásica del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico. En el panel A se puede observar el efecto antiangiogénico del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico, pues el disco de nitrocelulosa utilizado como vehículo liberador de sustancia aparece desprovisto de vasos casi en su totalidad.
- 20 9. Imágenes de una placa psoriásica hiperqueratósica localizada en la región posterior del codo izquierdo. La imagen A representa el aspecto de la placa psoriásica antes de iniciarse el tratamiento. La imagen B es un aspecto de la misma placa tras seis días de tratamiento con una crema al 5% conteniendo como componente activo la sal potásica del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico. La imagen C muestra el aspecto de la placa psoriásica tras dos semanas de tratamiento con la sal potásica del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico formulada al 5%. Los números que aparecen en las imágenes corresponden a la fecha en que se realizaron las fotografías.
- 25 30

REIVINDICACIONES

- 1.- Uso del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico o de cualquiera de sus sales
5 farmacéuticamente aceptables en la fabricación de medicamentos de aplicación en el tratamiento de enfermedades angiodependientes.
- 2.- Uso según la reivindicación 1 en que la enfermedad angiodependiente presenta además una disminución de la apoptosis
10
- 3.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en el que el medicamento fabricado es de aplicación en el tratamiento del cáncer.
- 4.- Uso según la reivindicación 3 caracterizado porque el medicamento
15 fabricado se utiliza como potenciador del efecto antiproliferativo de los fármacos citostáticos, en el tratamiento del cáncer.
- 5.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 caracterizado porque la sal utilizada preferentemente en la fabricación del medicamento es la sal
20 potásica del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico.
- 6.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 caracterizado porque la sal utilizada preferentemente en la fabricación del medicamento es la sal
25 cálcica del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico.
- 7.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 6 en que el medicamento fabricado comprende además una cantidad adecuada de al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 30 8.- Uso según la reivindicación 1 en el que el medicamento fabricado es de aplicación en el tratamiento de la psoriasis.

9.- Uso según la reivindicación 8 caracterizado porque la sal utilizada preferentemente en la fabricación del medicamento es la sal potásica del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico.

5 10.- Uso según la reivindicación 8 caracterizado porque la sal utilizada preferentemente en la fabricación del medicamento es la sal cálcica del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico.

10 11.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 8 a 10 en que el medicamento fabricado comprende además una cantidad adecuada de al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

12.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, caracterizado porque el medicamento consiste en una formulación de aplicación tópica.

15

13.- Uso según la reivindicación 12, caracterizado porque el medicamento se trata de una crema o pomada cuya composición comprende:

- 20
- Una cantidad farmacéuticamente eficaz del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico o de cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables
 - Una cantidad farmacéuticamente aceptable de al menos un alcohol
 - Una cantidad farmacéuticamente aceptable de al menos un emulgente
 - Una cantidad farmacéuticamente aceptable de al menos un excipiente

25

 - formador de una fase lipídica, particularmente vaselina
 - Agua destilada

14.- Uso según la reivindicación 13, caracterizado porque el medicamento es una crema o pomada que presenta una composición que comprende:

- 30
- 5% de la sal potásica del ácido 2,5-dihidrobencenosulfónico
 - 2,5% alcohol cetílico
 - 2,5% alcohol esteárico

20

30% vaselina líquida

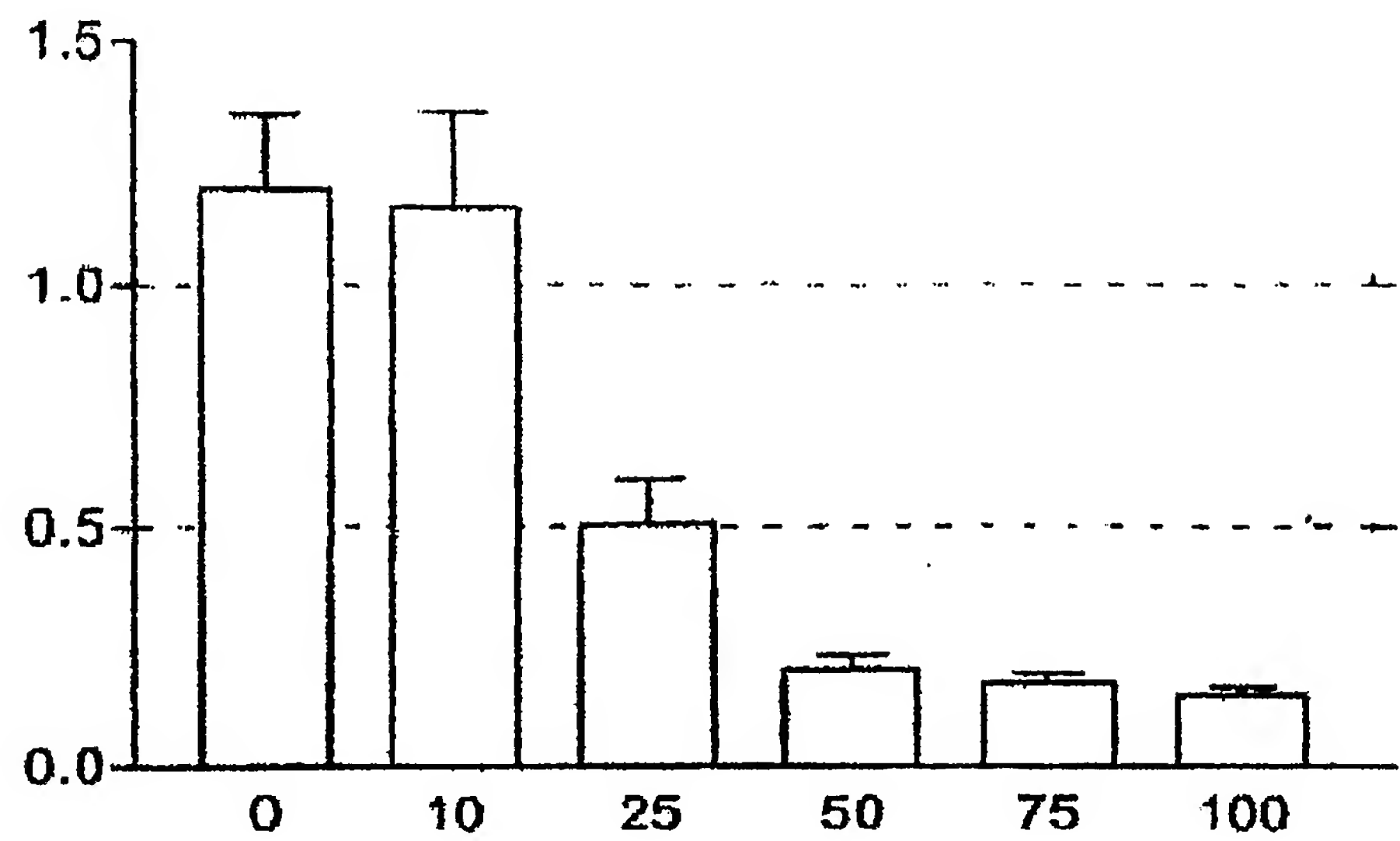
20% vaselina filante

5% span

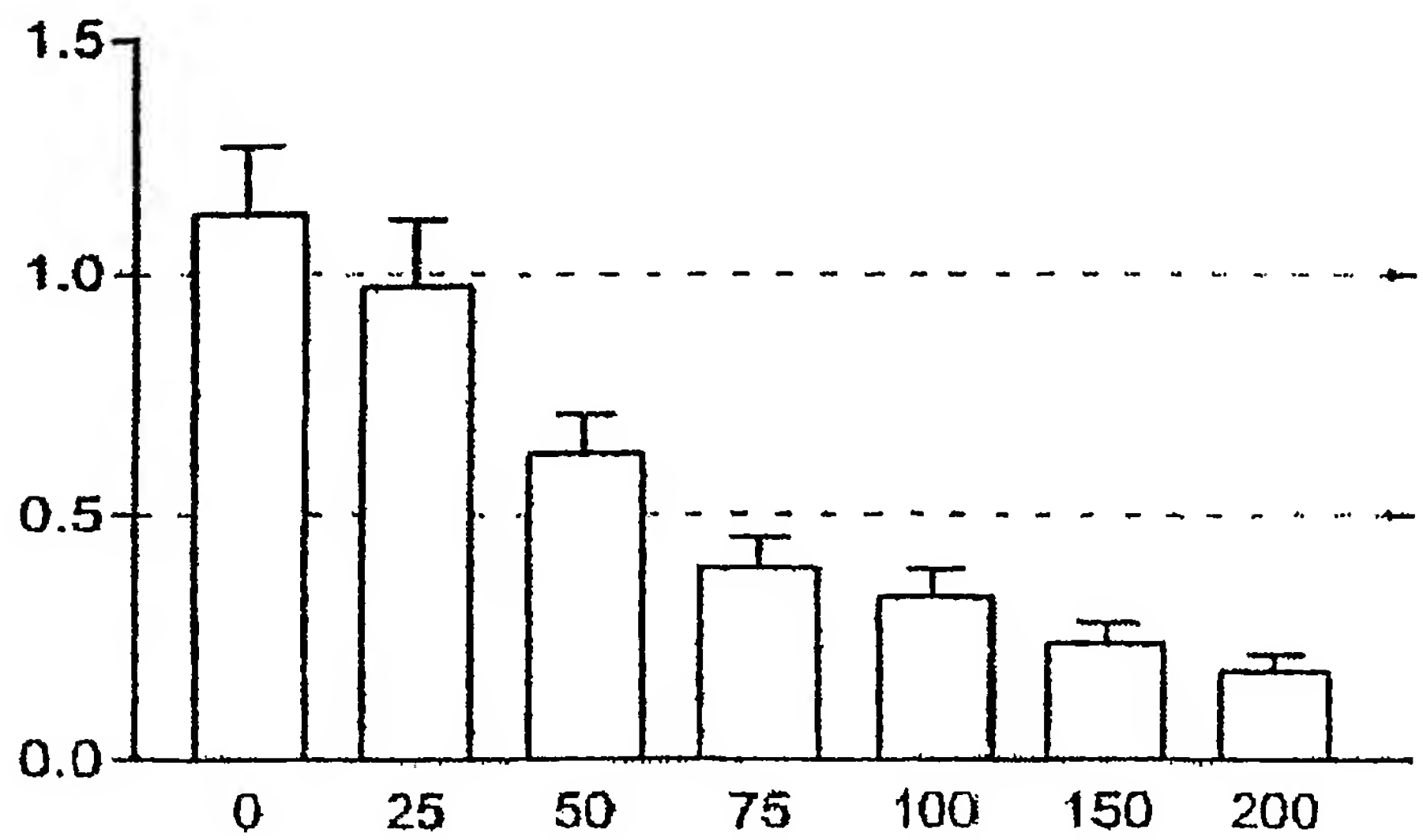
c.s.p. 100g de agua destilada.

5

1 / 9



A



B

FIG. 1

2 / 9

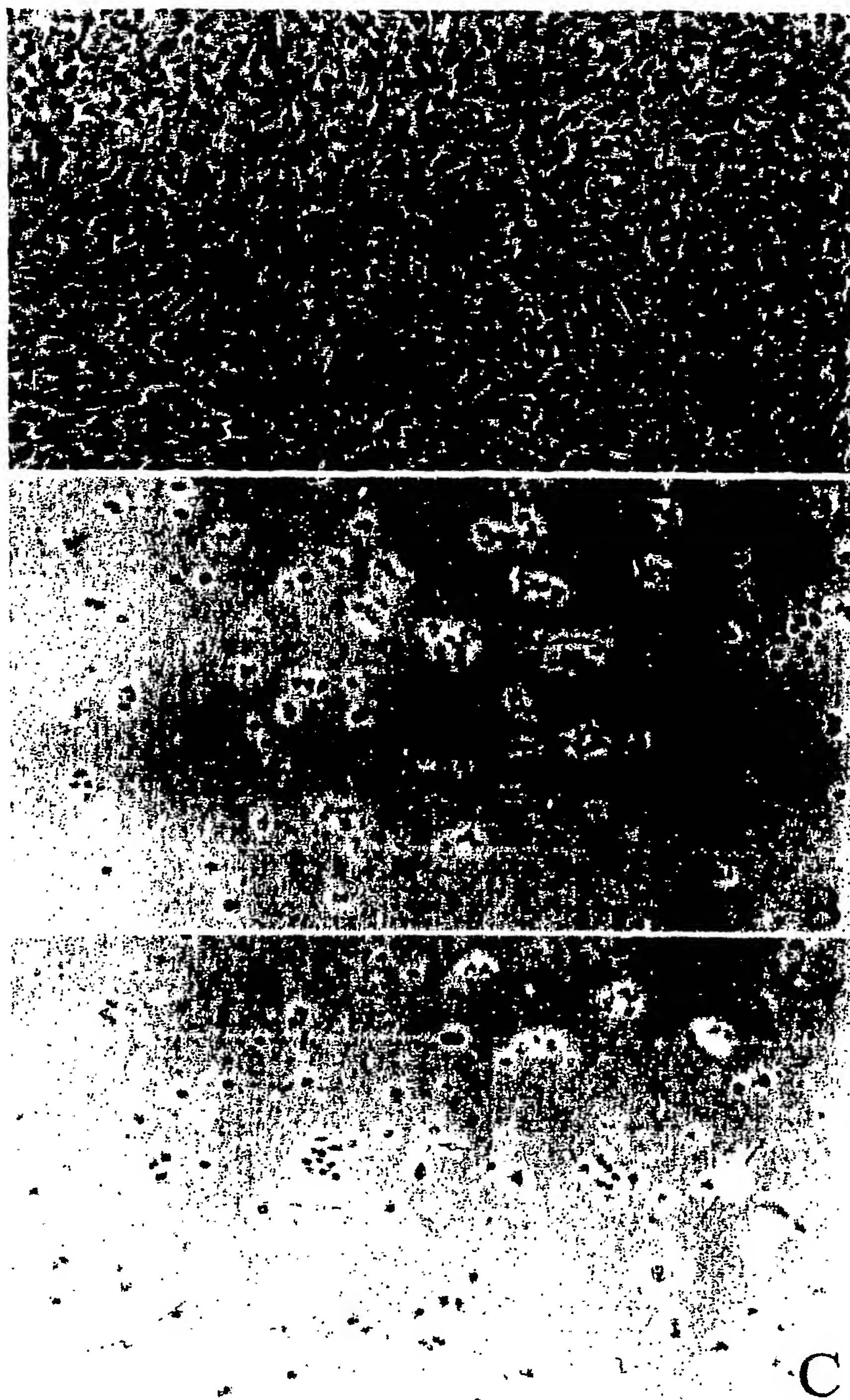
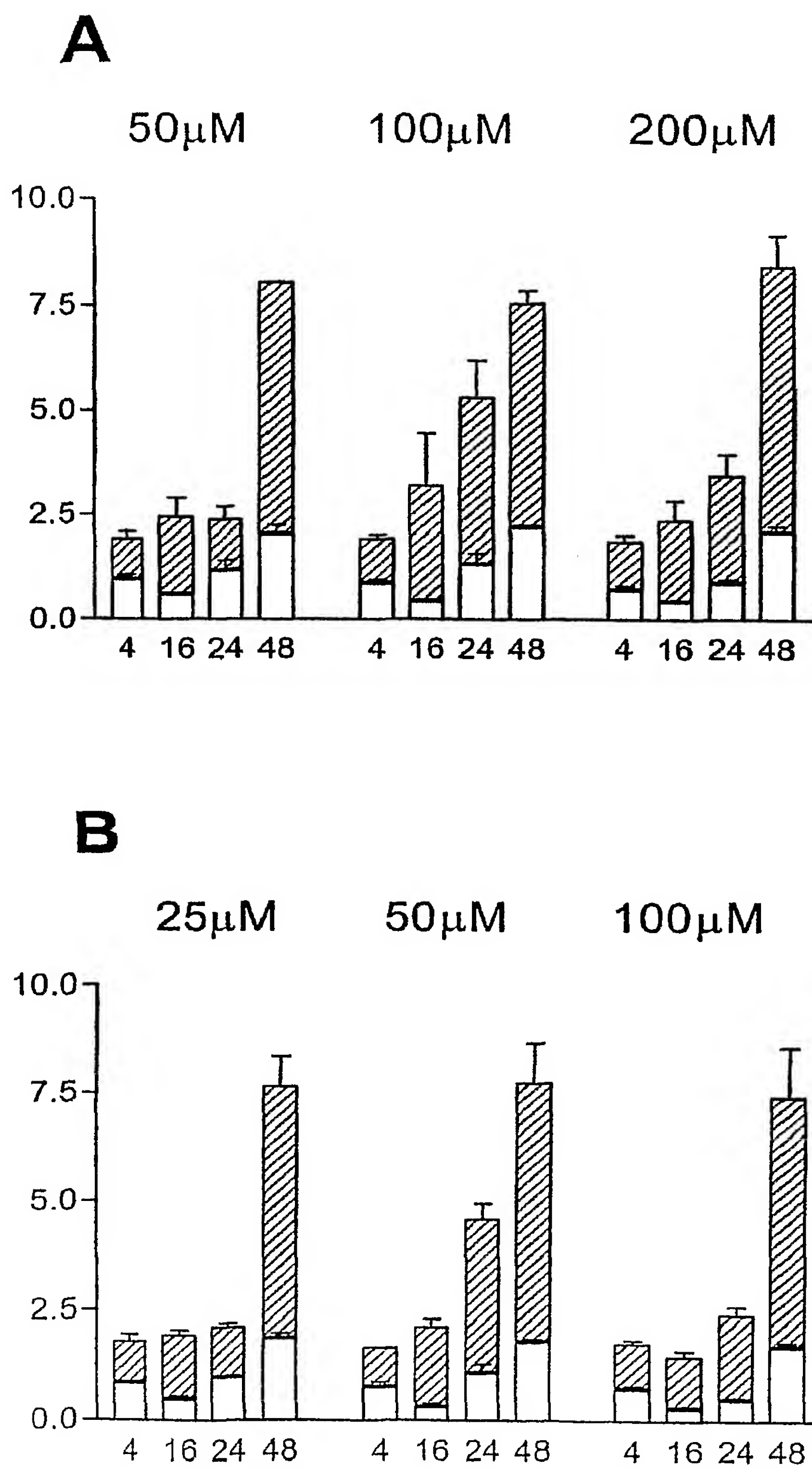


FIG. 2

3 / 9

**FIG. 3**

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

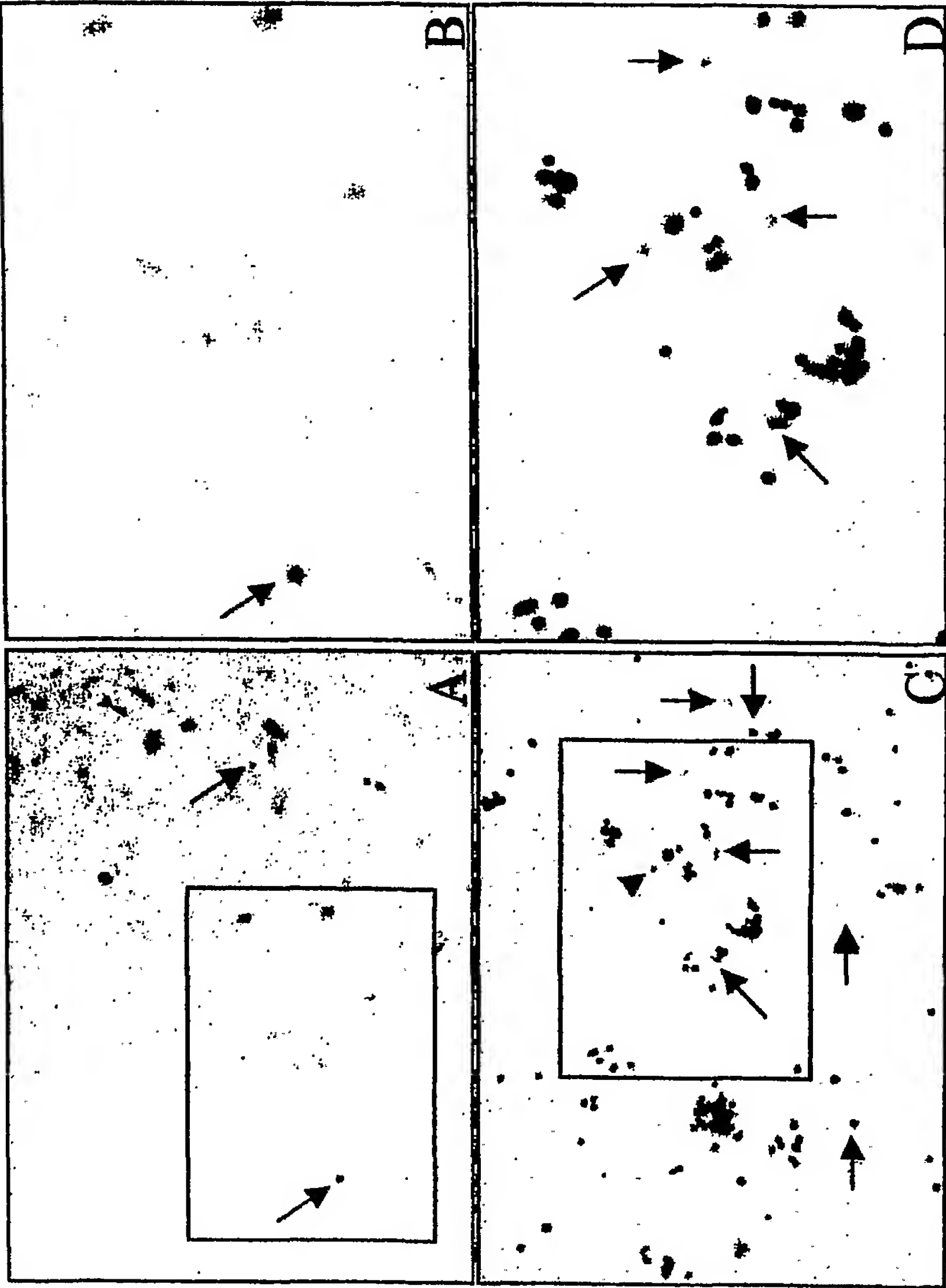


FIG. 4

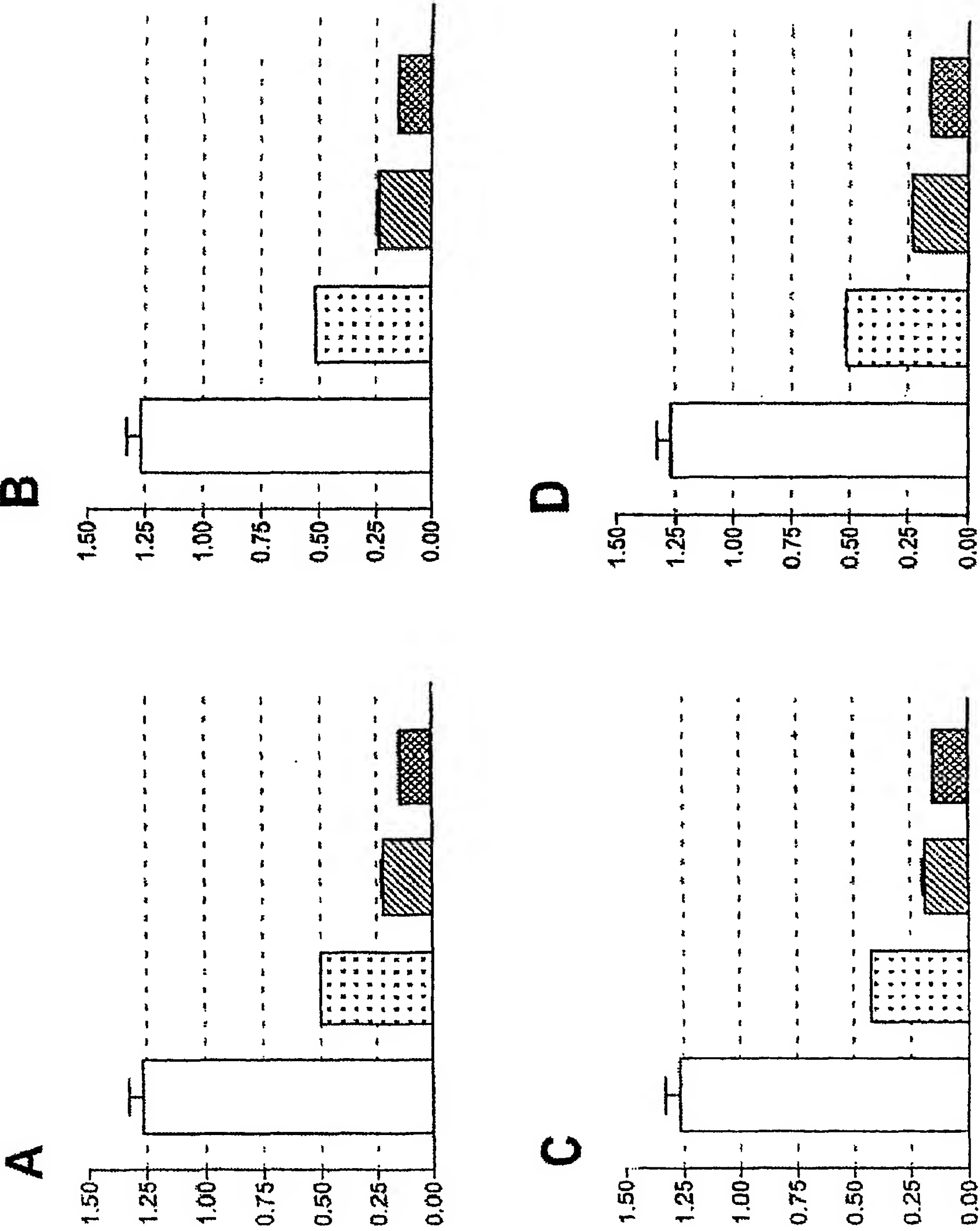


FIG. 5

		B
		A

FIG. 6

7 / 9

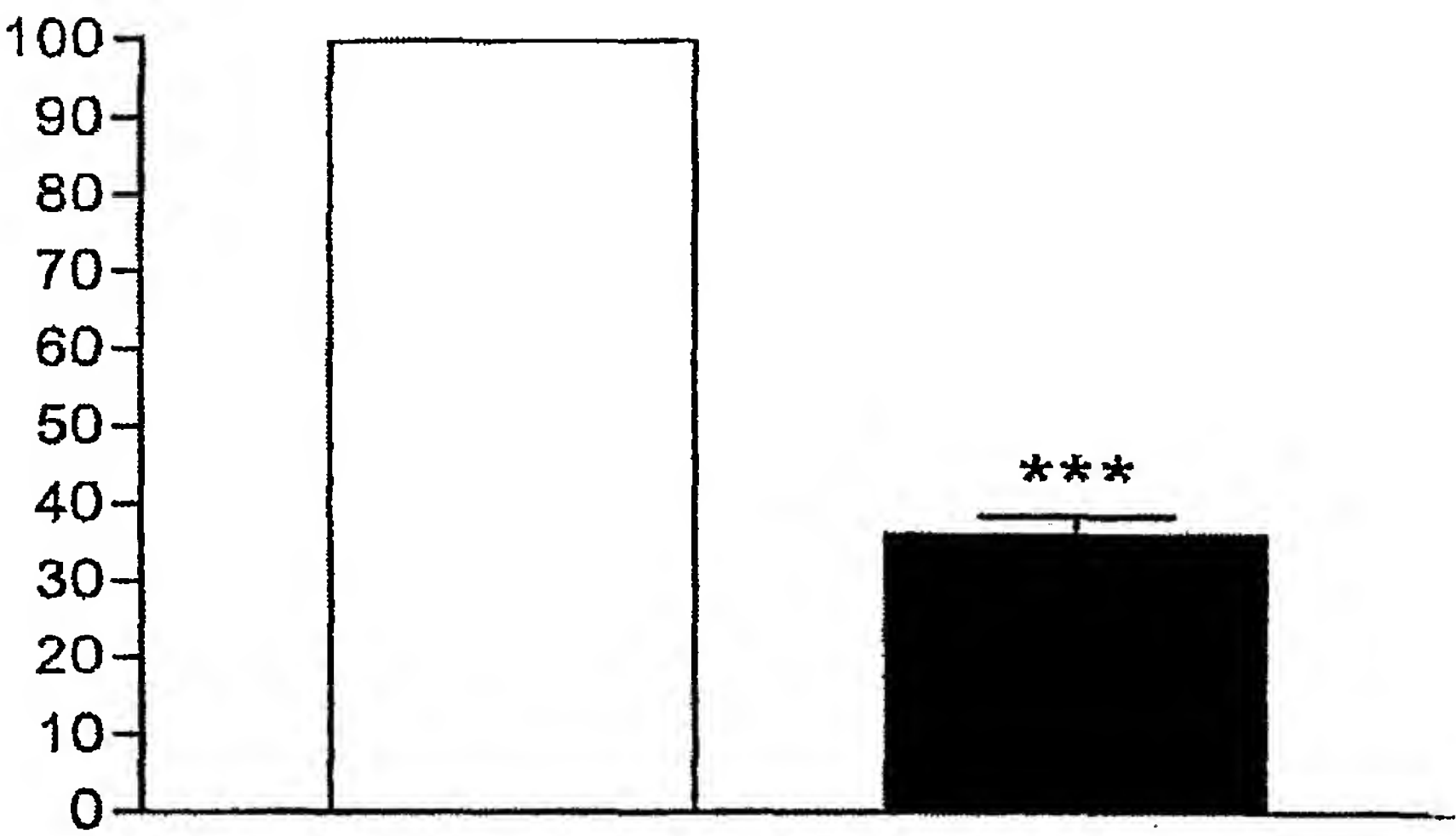


FIG. 7

8 / 9

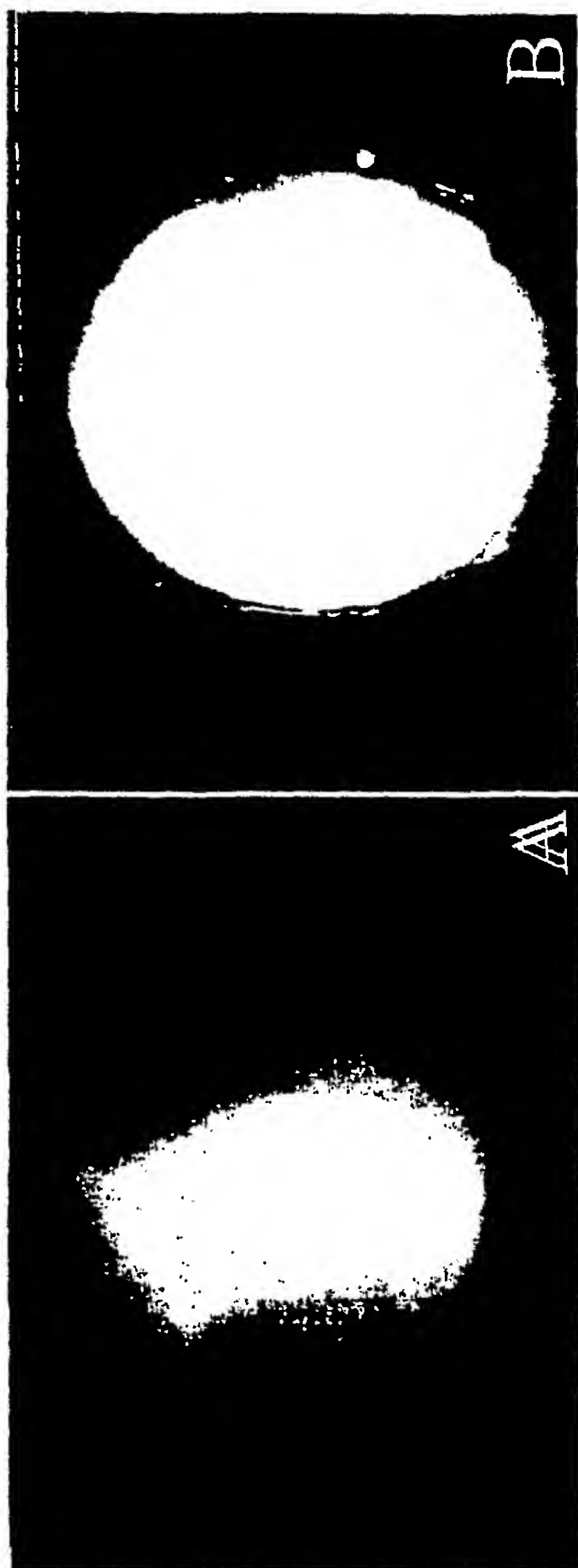


FIG. 8

9 / 9

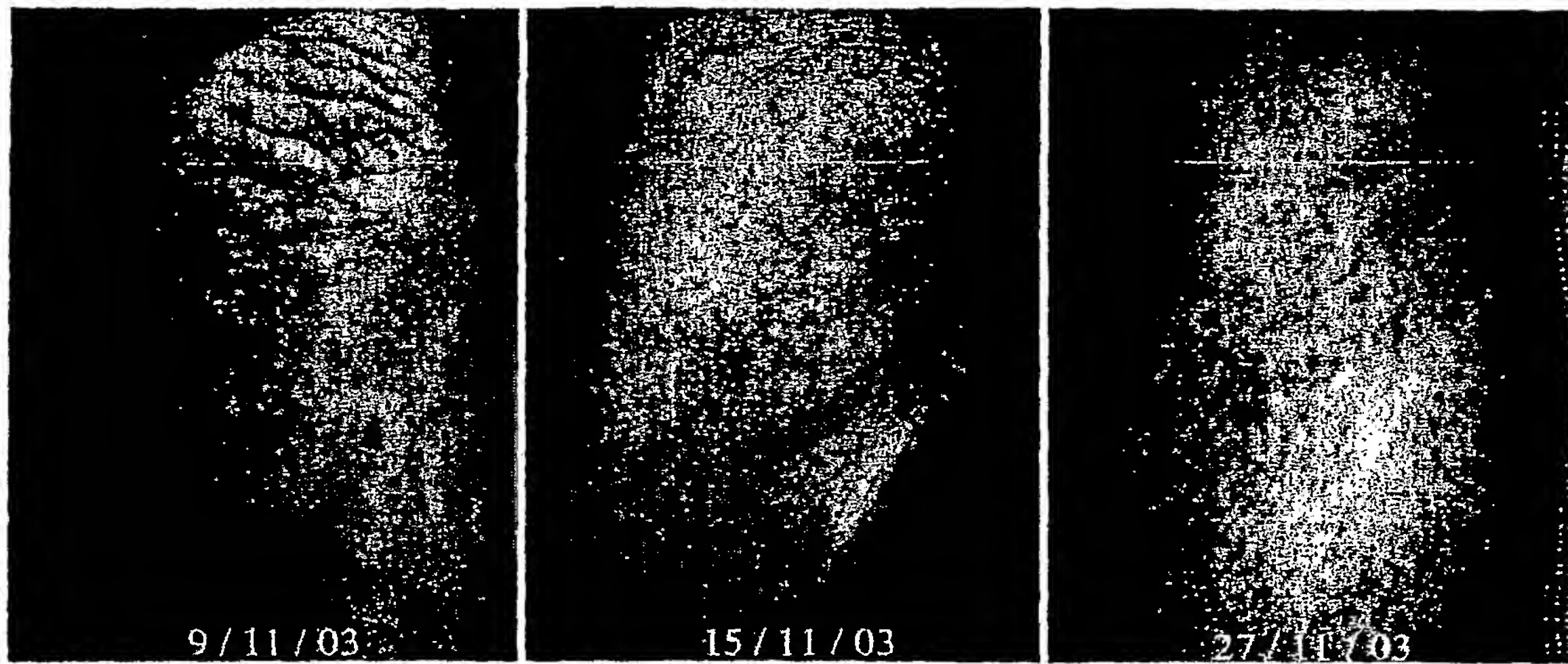


FIG. 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2005/070017

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC ⁷ A61K 31/185, , A61P 35/00, A61P 17/06		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC ⁷ A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CIBEPAT, EPODOC, REGISTRY, HCAPLUS, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NOUR A.F. & SALAM S. Preliminary clinical study with calcium dobesilate in fibrocystic disease of the breast, a pilot study. Invasive Treatment. 1986, Volume 12, N° 3, pages 233-242. The whole document.	1,2,5-7
X	RUIZ, E. & TEJERINA, T. Calcium dobesilate increases endothelium-dependent relaxation in endothelium-injured rabbit aorta. Pharmacological Research. 1998, Volume 38, N° 5, pages 361-366. (abstract) HCAPLUS [on line] [recovered on 02.02.2005]. Recovered from: STN International, Columbus, Ohio (EE.UU.). Access Nr. 1999:6013.	1,6
A	GRABER, R. y col. Calcium dobesilate protects human peripheral blood mononuclear cells from oxidation and apoptosis. Apoptosis. 1998, Volume 3, N° 1, pages 41-49. (abstract) HCAPLUS [on line] [recovered on 02.02.2005]. Recovered from: STN International, Columbus, Ohio (EE.UU.). Access Nr. 1998:171183.	1,2,6
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
13 June 2005 (13.06.05)		22 June 2005 (22. 06.05)
Name and mailing address of the ISA/ SPTO		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ ES 2005/070017

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ A61K 31/185, , A61P 35/00, A61P 17/06

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, REGISTRY, HCAPLUS, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	NOUR A.F. & SALAM S. Preliminary clinical study with calcium dobesilate in fibrocystic disease of the breast, a pilot study. Acta Therapeutica. 1986, Volumen 12, N° 3, páginas 233-242. Todo el documento.	1,2,5-7
X	RUIZ, E. & TEJERINA, T. Calcium dobesilate increases endothelium-dependent relaxation in endothelium-injured rabbit aorta. Pharmacological Research. 1998, Volumen 38, N° 5, páginas 361-366. (resumen) HCAPLUS [en línea] [recuperado el 02.02.2005]. Recuperado de: STN International, Columbus, Ohio (EE.UU.). N° de acceso 1999:6013.	1,6
A	GRABER, R. y col. Calcium dobesilate protects human peripheral blood mononuclear cells from oxidation and apoptosis. Apoptosis. 1998, Volumen 3, N° 1, páginas 41-49. (resumen) HCAPLUS [en línea] [recuperado el 02.02.2005]. Recuperado de: STN International, Columbus, Ohio (EE.UU.). N° de acceso 1998:171183.	1,2,6

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 13 Junio 2005 (13.06.2005)	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 22 JUNIO 2005 (22.06.2005)
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. C/Panamá 1, 28071 Madrid, España. N° de fax 34 91 3495304	Funcionario autorizado E. Albarrán Gómez N° de teléfono + 34 91 3495595